

Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines Laserscanmikroskops**Publication number:** DE19853407**Publication date:** 2000-05-31**Inventor:** ENGELHARDT JOHANN (DE); SCHREIBER FRANK (DE)**Applicant:** LEICA MICROSYSTEMS (DE)**Classification:****- international:** G02B21/00; G02B21/00; (IPC1-7): G02B21/00**- European:** G02B21/00M4A**Application number:** DE19981053407 19981119**Priority number(s):** DE19981053407 19981119**Also published as:**

WO0031576 (A1)

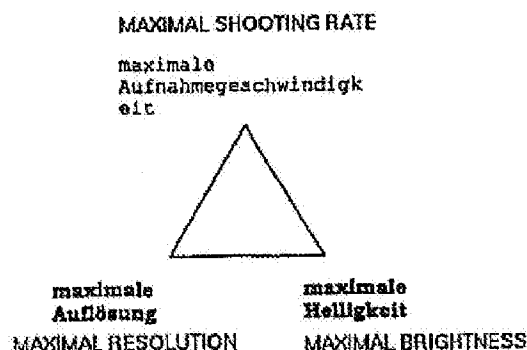
EP1131664 (A1)

EP1131664 (A0)

EP1131664 (B1)

[Report a data error here](#)**Abstract of DE19853407**

The present invention relates to a method for adjusting the system parameters of a confocal laser-scanning microscope, wherein the adjustment of the system parameters is carried out using a control computer. The purpose of this invention is to provide a simplified and safer handling of the microscope. To this end, this method is characterised in that the user is guided by a dialog in which, when inputting at least one object parameter and/or at least one system parameter, said user is proposed adjustments for the other system parameters and/or the other system parameters are automatically adjusted.



Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 198 53 407 A 1

51 Int. Cl.⁷:
G 02 B 21/00

21 Aktenzeichen: 198 53 407.8
22 Anmeldetag: 19. 11. 1998
43 Offenlegungstag: 31. 5. 2000

DE 198 53 407 A 1

71 Anmelder:
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 69120
Heidelberg, DE
74 Vertreter:
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

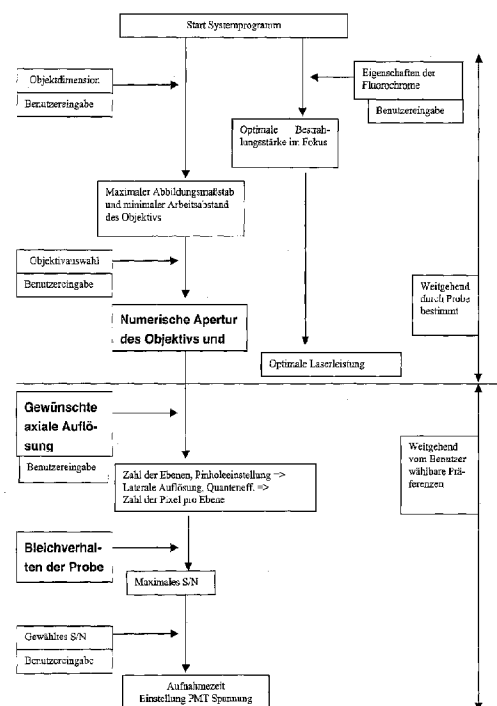
72 Erfinder:
Engelhardt, Johann, Dr., 76669 Bad Schönborn, DE;
Schreiber, Frank, 65779 Kelkheim, DE
56 Entgegenhaltungen:
DE 39 33 964 C2
DE 69 022 06 3T2
CH 6 47 877 A5

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

64 Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines Laserscanmikroskops

57 Ein Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines vorzugsweise konfokalen Laserscanmikroskops, wobei die Einstellung der Systemparameter über einen Steuercomputer erfolgt, ist zur einfachen und dabei sicheren Handhabung eines Laserscanmikroskops gekennzeichnet durch eine Benutzerführung im Dialog, wobei dem Benutzer auf Eingabe mindestens eines Objektparameters und/oder mindestens eines ggf. auswählbaren Systemparameters Einstellungen der übrigen Systemparameter vorgeschlagen werden und/oder die übrigen Systemparameter automatisch eingestellt werden.



DE 198 53 407 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines vorzugsweise konfokalen Laserscannmikroskops, wobei die Einstellung der Systemparameter über einen Steuercomputer erfolgt.

Die Erfindung bezieht sich auf den Bereich der Laserscannmikroskopie, insbesondere auf den Bereich der konfokalen Laserscannmikroskopie. Laserscannmikroskope sind seit Jahren aus der Praxis bekannt. Lediglich beispielhaft wird hierzu auf die DE 196 54 211 A1 verwiesen. Konfokale Laserscannmikroskope erfordern vom Anwender hinreichende Kenntnis über die Bedienung eines solchen Laserscannmikroskops, nämlich zur Einstellung der voneinander abhängigen und oftmals auch einander entgegenwirkenden bzw. einander ausschließenden Systemparameter. Dazu gehören der Pinhole-

durchmesser, die Hochspannung des Photomultiplier (PMT), die Laserleistung, etc. Zur optimalen Einstellung der Systemparameter, insbesondere unter Berücksichtigung objektspezifischer Eigenschaften, muß der Benutzer auf seine Erfahrungen mit dem Umgang solcher Laserscannmikroskope zurückgreifen. Jedenfalls ist es für einen Benutzer bislang kaum möglich gewesen, optimale Aufnahmeergebnisse ohne umfassende einschlägige Erfahrung erzielen zu können.

Insbesondere im Hinblick auf die quantitative konfokale Laserscannmikroskopie ist eine Beurteilung der aufgenommenen Bilddaten bzgl. der Datenqualität ein wichtiges Kriterium. Qualitätsmerkmal der Datenaufnahme kann bspw. das Signal-Rausch-Verhältnis oder die erzielte Auflösung sein. Daher ist eine optimale Daten-Aufnahmestrategie Voraussetzung für die erfolgreiche quantitative konfokale Laserscannmikroskopie in der breiten Anwendung.

Aufgrund der voranstehend genannten Komplexität bei der Einstellung konfokaler Laserscannmikroskope werden die Betriebs- bzw. Systemparameter bei Laserscannmikroskopen von zahlreichen Benutzern nicht optimal eingestellt. Vor allem die Unkenntnis der teilweise sehr komplizierten Zusammenhänge verschiedener optischer und elektronischer Randparameter eines konfokalen Laserscannmikroskops sind die Ursache für eine bislang unzureichende Bedienung. Erfolgt die Einstellung eines solchen Laserscannmikroskops aber nicht optimal, so läßt sich eine Bildaufnahme nur mit reduzierter Bildqualität oder einer viel zu langen Einstellungsprozedur vor der eigentlichen Bildaufnahme vornehmen. Eine zu lange Einstellungsphase vor der eigentlichen Bildaufnahme reduziert jedoch die Effizienz eines solchen Mikroskops und führt meist zu einem übermäßigen Verschleiß der Laserlichtquelle und/oder der mit dem Laserlicht beaufschlagten Lichtleitfasern sowie möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der Probe.

Die bislang aus der Praxis bekannten Laserscannmikroskope sind insbesondere auch beim Einlernen neuer Benutzer problematisch, da stets Anweisungen und Hilfestellungen erfahrener Benutzer erforderlich sind. Jedenfalls ist es bislang schwierig, die optimale Nutzung eines Laserscannmikroskops autodidaktisch zu erlernen. Vielmehr ist bei bisherigen Laserscannmikroskopen eine äußerst lange Einlernphase mit der Hilfestellung erfahrener Benutzer zwingend erforderlich.

Ein weiteres Problem aus der bisherigen Praxis ist darin zu sehen, daß zahlreiche Fluoreszenzobjekte mit sehr langen Einstellungsphasen ausbleichen. Da jedoch lange Einstellungsphasen meist nicht auszuschließen sind, ist die Anwendung der aus der Praxis bislang bekannten Laserscannmikroskope insbesondere bei biologischen Proben eingeschränkt und insoweit problembehaftet. Grundsätzlich gilt es daher, die Zeitdauer zur optimalen Einstellung ganz erheblich zu reduzieren.

Angesichts der voranstehend genannten Probleme liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines vorzugsweise konfokalen Laserscannmikroskops anzugeben, wobei die Einstellung der Systemparameter über einen Steuercomputer erfolgt. Mit diesem Verfahren soll eine sichere und dabei reproduzierbare Einstellung des Laserscannmikroskops möglich sein, und zwar unter Berücksichtigung vorgegebener System-/Objektparameter.

Das erfindungsgemäße Verfahren löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruches 1. Danach ist das Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines vorzugsweise konfokalen Laserscannmikroskops gekennzeichnet durch eine Benutzerführung im Dialog, wobei dem Benutzer auf Eingabe mindestens eines Objektparameters und/oder mindestens eines ggf. auswählbaren Systemparameters Einstellungen der übrigen Systemparameter vorgeschlagen werden und/oder die übrigen Systemparameter automatisch eingestellt werden.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, daß eine Reduzierung der zur optimalen Einstellung erforderlichen Zeit nur dann – sinnvoll und dabei reproduzierbar – möglich ist, wenn eine Benutzerführung im Dialog auf der Grundlage der physikalischen Zusammenhänge bzw. der Formeln aus dem Anhang erfolgt. Mit anderen Worten verfügt der Steuercomputer über eine entsprechende Software, die im Dialog eine Benutzerführung generiert. Auf Eingabe mindestens eines Objektparameters und/oder gegebenenfalls eines auswählbaren Systemparameters werden dem Benutzer Einstellungen der übrigen Systemparameter vorgeschlagen. Nach Auswahl oder – ebenfalls wahlweise – automatisch werden die übrigen Systemparameter unter Zugrundelegung des softwaremäßigen Vorschlags eingestellt. Dabei ist wesentlich, daß im Dialog grundsätzlich eine quasi optimale Einstellung der Systemparameter vorgeschlagen wird. Je nach Auswahl eines einzelnen Systemparameters oder mehrerer Systemparameter werden die anderen Systemparameter auf die getätigte Auswahl angepaßt und erfolgt im Rahmen der Vorgabe bzw. der Vorgaben eine weiterreichende Optimierung. Gleiches gilt hinsichtlich der Objektparameter.

In vorteilhafter Weise umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren die Möglichkeit, wonach auf Eingabe mindestens eines Objektparameters und/oder eines gegebenenfalls auswählbaren Systemparameters und/oder mindestens einer definierbaren Problemstellung betreffend die Bildaufnahme und/oder betreffend das aufzunehmende Objekt Optimierungspfade zur Systemeinstellung und/oder Aufnahmestrategien vorgeschlagen werden. Insoweit umfaßt die Benutzerführung ein quasi intelligentes System bzw. eine entsprechende Datenbank, die nach Vorgabe einzelner Objekt-/Systemparameter oder nach Vorgabe einer spezifischen Problemstellung Optimierungspfade zur Systemeinstellung bzw. Aufnahmestrategien vorschlägt. Der Benutzer kann dann unter Zugrundelegung seiner Vorgaben eine für seinen Bedarf optimale Aufnahmestrategie auswählen.

Die vorgebbaren Systemparameter einer ausgewählten Systemeinstellung oder Aufnahmestrategie können – wahlweise – automatisch über die Benutzerführung eingestellt werden, und zwar vorzugsweise nach einer vom Benutzer einzugebenden Bestätigung. Eine Sicherheitsabfrage kann dabei vorgesehen sein.

Im Dialog lassen sich zahlreiche Objekt-/Systemparameter (vor-)auswählen. Dazu gehören beispielsweise die aufzu-

nehmende Objektdimension, der aufzunehmende Objektbereich, die Anzahl der optischen Schnitte in bzw. durch ein Objekt, die aufzunehmende Objekteigenschaft, die Nachweismethode, etc. Bei den in Frage kommenden Nachweismethoden kann es sich um die Anwendung des Fluoreszenzverfahrens und des Reflexionsverfahrens handeln. An dieser Stelle sei angemerkt, daß die Vorgabe der voranstehend genannten Parameter mittels freier Eingabe oder per Auswahl aus einem vorgegebenen und gegebenenfalls vom Benutzer erweiterbaren Menü erfolgen kann.

Des weiteren ist es möglich, daß im Dialog die die Vorrichtung betreffenden Parameter auswählbar bzw. vorgebar sind. So könnte die Verwendung eines geeigneten Objektivs mit möglichst hoher numerischer Apertur zur Erzielung maximaler Auflösung vorgeschlagen werden, und zwar unter Zugrundelegung bereits ausgewählter System-/Objektparameter. Außerdem könnte im Dialog die mit dem ausgewählten Objektiv maximal erzielbare Auflösung mitgeteilt werden. Unter Zugrundelegung bereits ausgewählter bzw. ermittelter und gegebenenfalls bereits eingestellter Systemparameter könnte die aktuell erreichbare Auflösung mitgeteilt werden, um nämlich überprüfen zu können, ob diese Auflösung unter Zugrundelegung der vorgegebenen Systemparameter auch tatsächlich ausreicht. Insoweit könnte die Benutzerführung alternative Voreinstellungen vorschlagen, nämlich zum Erreichen einer höheren Auflösung.

Ebenso ist es denkbar, daß im Dialog die Anzahl der Pixel pro Bildebene vorgeschlagen wird.

Die im Dialog einzugebende oder auszuwählende Objekteigenschaft dient zur Ermittlung der optimalen Bestrahlungsstärke, die ebenfalls im Dialog zur Einstellung vorgeschlagen wird. Die optimale Bestrahlungsstärke bzw. Laserleistung – ebenfalls unter Zugrundelegung vorgegebener System-/Objektdaten – wird ebenfalls im Dialog vorgeschlagen. Des weiteren ist es denkbar, daß die optimale Bestrahlungsstärke bzw. Laserleistung automatisch gegebenenfalls nach Freigabe durch den Benutzer – eingestellt wird.

Zur Einstellung des Detektionspinhole-Durchmessers wird im Dialog ein optimaler Wert vorgeschlagen, bei dem die Auflösung der Bildaufnahme bei noch brauchbarem Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Bildaufnahme maximal ist. Ebenso ist es denkbar, daß zur Einstellung des Detektionspinhole-Durchmessers ein optimaler Wert im Dialog vorgeschlagen wird, bei dem das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Bildaufnahme bei noch brauchbarer Auflösung der Bildaufnahme maximal ist.

Wie bereits zuvor erwähnt, bietet die in erfindungsgemäßer Weise vorgesehene Benutzerführung ganz erhebliche Vorteile und Erleichterungen. So in weiter vorteilhafter Weise auch dahingehend, daß bei Vorgabe oder Veränderung mindestens eines Systemparameters im Dialog all diejenigen Systemparameter mitgeteilt werden, die durch die Vorgabe oder Veränderung beeinflusst werden. Mittels der Benutzerführung kann im Dialog mitgeteilt werden, wie unter Zugrundelegung der Vorgabe oder Veränderung von Parametern eine Bildaufnahme mit bestmöglicher Bildqualität realisierbar ist. Insoweit lassen sich vom Benutzer verschiedene Optimierungspfade auswählen, und zwar unter Zugrundelegung vorgegebener Objekt-/Systemparameter und unter Zugrundelegung geänderter Objekt-/Systemparameter.

In ganz besonders vorteilhafter Weise, insbesondere im Hinblick auf besondere Aufnahmetechniken bzw. im Hinblick auf bestimmte Applikationen, ist es von ganz besonderem Vorteil, wenn mindestens ein für die Aufnahme bzw. Applikation wichtiges Kriterium zu dessen Optimierung vorgebar ist. Aufgrund dieser Vorgabe werden dann im Rahmen der Benutzerführung die weiteren Systemparameter im Dialog vorgeschlagen und/oder möglicherweise nach Abfrage und benutzerseitiger Bestätigung – automatisch eingestellt. Bei dem vorgegebenen Kriterium könnte es sich beispielsweise um das zu erzielende Signal-zu-Rausch-Verhältnis handeln. Die Vorgabe anderer Kriterien ist ebenso möglich, wobei eine Anpassung der übrigen Systemparameter – darauf hin – stattfindet.

Mittels Benutzerführung könnten im Dialog Hilfestellungen oder Lösungen für vorgegebene Problemsituationen angeboten werden. Bei den Problemsituationen könnte es sich um unterschiedliche Problemfälle handeln, so beispielsweise um den Problemfall, wonach die Probe (bei Fluoreszenzobjekten) zu stark bleicht, wonach die Bilddaten zu "verrauscht" sind, wonach die Meßzeit zu lange ist oder wonach die Auflösung der Bildaufnahme zu gering ist. Entsprechend dieser Problemsituation werden im Dialog Hilfestellungen bzw. Lösungen angeboten, die vom Benutzer unter Zugrundelegung voreingestellter Systemparameter auswählbar sind. Unter Zugrundelegung der im Dialog gelieferten Hilfestellungen ist die Optimierung – im Dialog – möglich.

Ebenso ist es denkbar, daß zumindest teilweise voneinander abhängige oder einander entgegenwirkende Systemparameter mittels Algorithmus bzw. anhand entsprechender Gleichungen bestimmt werden. Dabei kann es sich um Gleichungen gemäß Anhang handeln.

Des weiteren ist es denkbar, daß die Systemparameter unter Berücksichtigung sich gegenseitig ausschließender Eigenschaften bzw. Einstellungen im Dialog vorschlagen und nach Auswahl sowie gegebenenfalls nach Bestätigung automatisch eingestellt werden. Diese sich gegenseitig beeinflussenden oder gar ausschließenden Eigenschaften sind in **Fig. 1** im Sinne eines "Qualitätsdreiecks" dargestellt. Bei den sich gegenseitig ausschließenden bzw. einander entgegenwirkenden Faktoren handelt es sich um die maximale Auflösung, maximale Helligkeit und maximale Aufnahmegeschwindigkeit.

In besonders vorteilhafter Weise werden die Systemparameter unter Berücksichtigung der Vorgaben aus einem in der Datenbank abgelegten Expertensystem abgerufen, wobei dieses Expertensystem einerseits Erfahrungswerte und andererseits Algorithmen unter Berücksichtigung des Qualitätsdreiecks umfassen kann. Des weiteren ist es denkbar, daß die Systemparameter unter Berücksichtigung der Vorgaben unter Verwendung von Fuzzy-Logic ermittelt und nach Auswahl oder automatisch – gegebenenfalls nach Bestätigung durch den Benutzer – eingestellt werden, wobei Maßnahmen nach Fuzzy-Logic dem Expertensystem einverleibt sein können.

Die Benutzerführung könnte des weiteren derart ausgelegt sein, daß bei Vorgabe und/oder Änderung mindestens eines Systemparameters im Dialog mitgeteilt wird, daß und bejahendenfalls inwiefern die Bildaufnahme im Hinblick auf eine Eigenschaft der Bildaufnahme, so beispielsweise im Hinblick auf die Auflösung, das Sampling, etc. beeinflusst wird. Insoweit handelt es sich um ein "weitsichtiges" System zur Benutzerführung, wonach nämlich Auswirkungen in Bezug auf die Qualität mitgeteilt werden. Des weiteren ist es von Vorteil, wenn dem Benutzer vor, während und nach der Bildaufnahme eine Information hinsichtlich der Qualität der zu erzielenden Bildaufnahme vermittelt wird, um nämlich überprüfen zu können, ob die Bildqualität unter Zugrundelegung einerseits der ausgewählten und andererseits der vom System vorgegebenen Systemparameter ausreicht.

Die vom Benutzer eingestellten bzw. veränderten Aufnahme- bzw. Systemparameter könnten vom Aufnahmeprogramm analysiert werden. Falls ein oder mehrere Systemparameter vom Benutzer "falsch" eingestellt wurden, kann das Programm automatisch und in Eigeninitiative den Benutzer in einen Dialog führen, mit dem Ziel, eine optimale System-einstellung wiederherzustellen. Hierzu müßte ein "Qualitäts-Dämon-Modul" des Programms während der Benutzung
 5 laufend die aktuellen Systemparameter analysieren und bei nicht-optimaler Einstellung das Dialog-Modul automatisch aufrufen.

Schließlich könnte die Benutzerführung in ganz besonders vorteilhafter Weise, insbesondere zur Einführung neuer Benutzer, ein Lernprogramm im Dialog führen, wonach der Benutzer zu optimalen Aufnahmestrategien angeleitet wird, und zwar unter Zugrundelegung objekt- oder problemspezifischer Systemeinstellungen. Das im Dialog geführte Lern-
 10 programm könnte auch als Trainingsprogramm für bereits erfahrene Benutzer ausgelegt sein, um nämlich die Arbeitsqualität der mit dem Fluoreszenzmikroskop arbeitenden Benutzer steigern zu können.

Gemäß **Fig. 1** schließen sich drei Merkmale bei der konfokalen Laserscannmikroskopie gegenseitig aus, nämlich die maximale Aufnahmegeschwindigkeit, die maximale Auflösung und die maximale Helligkeit. Will ein Benutzer beispielsweise eine hohe Ortsauflösung erreichen, so ist ein langes Scannen erforderlich. Das so erhaltene Signal ist meist
 15 stark reduziert. Ebenso verhält es sich mit den anderen Größen, die in **Fig. 1** im Rahmen des dortigen "Qualitätsdreiecks" dargestellt sind.

Bei der konfokalen Laserscannmikroskopie ist der Benutzer einer entsprechenden Vorrichtung grundsätzlich mit den folgenden Problemstellungen konfrontiert:

- 20 – die Probe bleicht bei Fluoreszenzobjekten zu stark,
- die Bilddaten sind "verrauscht",
- die Meßzeit ist zu lang und
- die Auflösung der Bildaufnahme ist zu gering

Durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dem Benutzer eine Benutzerführung bzw. ein Computer-Dialog an die Hand gegeben, wonach je nach konkreter Anwendung eine optimale Systemeinstellung möglich ist und entsprechende Aufnahmestrategien vorgeschlagen werden und vom Benutzer auswählbar sind. Jedenfalls kann bei der Optimierung das in **Fig. 1** gezeigte "Qualitätsdreieck" einbezogen werden.

Des weiteren werden dem Benutzer mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Hilfsmittel zur Hand gegeben, die es ihm ermöglichen, in Form einer computergestützten Benutzerführung für alle nur denkbaren Problemstellungen, insbesondere für die vier vorgenannten häufigsten Problemstellungen, Lösungsvorschläge zu erhalten, und zwar auch unter Zugrundelegung auswählbarer Voreinstellungen. Sofern der Benutzerführung ein Expertensystem einverleibt ist, kann der Benutzer auf Erfahrungswerte verschiedenster mikroskopischer Anwendungen und Fragestellungen zurückgreifen. Dabei ist es wiederum denkbar, ein lernfähiges System zu realisieren, d. h. eine sich mit jeder positiv beschiedenen Bildaufnahme automatisch oder nach ausdrücklicher Bestätigung seitens des Benutzers erweiternde Datei. Verfahren wie
 35 "Fuzzy-Logic" können implementiert werden, woraus sich die Systemeinstellungen weiter optimieren lassen.

Hinsichtlich des Verfahrensablaufs und einer dort stattfindenden Optimierung wird unter Bezugnahme auf die voranstehenden Ausführungen auf **Fig. 2** verwiesen.

Zur Verdeutlichung der beanspruchten Lehre sei nachfolgend ein konkretes Ausführungsbeispiel erläutert. Danach
 40 wird sich auf die bei bekannten Systemen zur Verfügung stehenden Einstellungsmöglichkeiten beschränkt. Die verwendete Probe ist ein mit Fluorescein gefärbter Drosophila Embryo. Dessen Abmessungen betragen lateral ca. 200 µm und axial ca. 100 µm. Die maximale Dichte ρ der Farbstoffmoleküle und die Eigenschaften des verwendeten Farbstoffs, wie die Bleichrate Λ , die Lebensdauer des angeregten Singulett- bzw. Triplettzustandes τ_s bzw. τ_T , die Wahrscheinlichkeit W_T für den Übergang in den Triplettzustand, der Wirkungsquerschnitt σ sowie die Emissions- und Anregungswellenlänge λ_{Em} und λ_{Ex} , sind hinreichend genau bekannt:

$\lambda_{Em} = 520 \text{ nm}$	$\lambda_{Ex} = 490 \text{ nm}$
$\tau_T = 10^{-6} \text{ s}$	$\tau_s = 4,5 \cdot 10^{-9} \text{ s}$
$\Lambda = 3 \cdot 10^{-5}$	$W_T = 0,03$
50 ρ	σ
$= 200 \mu\text{m}^{-3}$	$= 3,06 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$

Um die optimale Anpassung des Systems an die zu untersuchende Probe und an die Benutzerforderungen zu gewährleisten, werden folgende Verfahrensschritte realisiert:

1. Wahl des zu verwendenden Objektivs. Dieses folgt direkt aus den Abmessungen der zu untersuchenden Probe. Aus der minimalen lateralen Auflösung folgt die einzustellende Pixelzahl pro Bildebene.
2. Bestimmung der optimalen Bestrahlungsstärke im Fokus aus der Aufnahmezeit und den Eigenschaften der Fluoreszenzmoleküle.
3. Berechnung der einzustellenden Laserleistung aus der Fokusfläche und der optimalen Bestrahlungsstärke im Fokus.
4. Bestimmung des Detektionspinhole-Radius als Kompromiß zwischen erwarteter Auflösung und erwartetem Signal-Rausch-Verhältnis im Bild. Die Zahl der optischen Schnitte folgt aus der axialen Auflösung.
- 65 5. Anpassung der Photomultiplier-Spannung an das zu erwartende Signal-Rausch-Verhältnis im Bild.

Für das konkrete Beispiel ergeben sich folgende Informationen:

1. Der maximale Abbildungsmaßstab des Objektivs sollte 50 (10 mm/200 µm) nicht überschreiten und dessen Arbeits-

abstand sollte in der Größenordnung der Probendicke (0,1 mm) liegen. Die numerische Apertur (NA) ist unter diesen Nebenbedingungen maximal zu wählen. Man findet folgendes Objektiv:

$$M = 40, WD = 80 \mu\text{m}, NA = 1,0$$

Die laterale Auflösung des Mikroskops liegt mit dem gewählten Objektiv und unter Berücksichtigung der angegebenen Emissionswellenlänge der Fluoreszenzmoleküle zwischen 210 nm und 320 nm. Der genaue Wert ist abhängig vom eingestellten Pinhole-Radius. Unter Beachtung des Nyquist-Theorems beträgt die Zahl der pro Zeile aufzunehmenden Pixel n_1 :

$$n_1 = \frac{2}{r_{\text{res}}} \cdot 200 [\mu\text{m}]$$

und liegt somit zwischen 1920 und 1260. Beim verwendeten System kann die Pixelzahl im Bild auf die Werte 256^2 , 512^2 oder 1024^2 eingestellt werden. Im gegebenen Beispiel ist die maximale Pixelzahl von 1024^2 zu wählen. Da diese Zahl unterhalb der nach Nyquist berechneten Werte liegt, kann es sein, daß Artefakte im Bild auftreten. Ist dies der Fall, muß entweder das Scanfeld mit Hilfe des Zooms verkleinert werden, oder ein Objektiv mit kleinerer numerischer Apertur verwendet werden.

2. Die Aufnahmezeit pro Pixel ergibt sich aus der Aufnahmezeit pro Bildebene und der Zahl der Pixel pro Bildebene. Es ist zu beachten, daß durch das Rücksetzen des Scanspiegels nach jeder Bildzeile nur ca. die Hälfte der Aufnahmezeit zur Detektion genutzt wird. Bei einer Aufnahmezeit pro Bildebene von ca. 2 Sekunden erhält man für die Aufnahmezeit pro Pixel ca. 1 μs ; die für das Bleichen entscheidende Bestrahlungszeit pro Pixel beträgt ca. 2 μs .

Die Berechnung der optimalen Bestrahlungsstärke ergibt sich wie folgt:

$$E_s = \frac{1}{\sigma \cdot \tau_s} \approx 7,3 \cdot 10^{23} \left[\frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}} \right]$$

bzw.

$$E_T = \frac{1}{\sigma \cdot (\tau_s + W_T \cdot \tau_T)} \approx 9,5 \cdot 10^{22} \left[\frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}} \right]$$

Für den Fall, daß Triplettzustände vernachlässigt werden können, ergibt sich im konkreten Beispiel eine um Faktor 8 größere optimale Bestrahlungsstärke E_s . Die Vernachlässigung ist im Allgemeinen dann gerechtfertigt, wenn die Detektionszeit pro Pixel kleiner als die Lebensdauer des Triplettzustandes ist. Liegt die Detektionszeit in der Größenordnung der Lebensdauer des Triplettzustandes, wie im vorliegenden Beispiel, sollte deren Existenz bei der Berechnung der optimalen Bestrahlungsstärke berücksichtigt werden.

Es ist zu beachten, daß beide Werte auf der Erkenntnis beruhen, daß das beste Signal-Rausch-Verhältnis im Bild erreicht wird, wenn die Emissionsrate gleich der Anregungsrate der Fluoreszenzmoleküle ist. Grundsätzlich nähert sich das System diesem Gleichgewicht exponentiell an. Die Berechnung von E_s ignoriert die Existenz der Triplettzustände und macht die Annahme eines Gleichgewichts zwischen angeregtem Singulett- und Grundzustand. Die Berechnung von E_T geht von einem sofortigen Erreichen des Gleichgewichts zwischen allen drei Zuständen aus. Um während der gesamten Bestrahlungszeit ein Gleichgewicht zwischen Anregungs- und Emissionsrate zu erhalten, müßte die Bestrahlungsstärke in dieser Zeit exponentiell von E_s nach E_T streben. Beide Werte stellen also in jedem Fall eine mehr oder weniger gute Näherung dar.

3. Bei der benutzten Wellenlänge von 488 nm haben die Photonen eine Energie von ca. $4 \cdot 10^{-19}$ J. Die Fokussfläche $F_{\text{Fokus}} = \pi \cdot r_{\text{Airy}}^2$ beträgt ca. $2,8 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$. Damit erhält man einen Strahlungsfluß Φ von:

$$\Phi = h\nu \cdot E_T \cdot F_{\text{Fokus}} \approx 100 \mu\text{W}$$

Da nur ca. 10% des eingekoppelten Strahlungsflusses in den Fokus des Objektivs gelangen, ist die Laserleistung auf ca. 1 mW einzustellen. Für den Fall, daß Triplettzustände vernachlässigt werden können – also bei kürzeren Aufnahmezeiten – ergibt sich für Fluorescein eine einzustellende Laserleistung von ca. 8 mW.

4. Die Zahl der benötigten optischen Schnitte erhält man aus der Dicke der Probe, dem axialen Auflösungsvermögen und dem Nyquist-Theorem. Da eine Einstellung des Detektions-Pinholes über 8 optische Einheiten zu einer schlechten Bildqualität führt, liegt die axiale Auflösung zwischen 0,6 μm und 1,8 μm . Die Zahl der optischen Schnitte liegt damit unter Ausnutzung des gesamten Arbeitsabstandes zwischen 270 und 90. Da nur mit einem einzigen Kanal detektiert wird, liegt die Größe des aufgenommenen Datensatzes damit zwischen 270 und 90 Megabyte. Evtl. kann die Zahl der optischen Schnitte an dieser Stelle auch praktisch durch den Arbeitsspeicher des Systems begrenzt sein.

Im allgemeinen strebt der Anwender nach dem maximalen axialen Auflösungsvermögen. Das Signal-Rausch-Verhältnis soll dabei eine bestimmte Schwelle nicht unterschreiten.

Bei einem eingestellten Detektionspinhole-Radius von ca. 2 optischen Einheiten erreicht das Mikroskop nahezu das maximale axiale Auflösungsvermögen. Das laterale Auflösungsvermögen beträgt ca. 260 nm.

Aus der axialen Auflösung z_{res} , der Dicke der Probe und dem Nyquist-Theorem erhält man die Zahl der aufzunehmenden Schnitte n_2 :

$$n_z = \frac{2}{z_{\text{res}}} \cdot 80 \mu\text{m} = 270.$$

- 5 Aus der axialen Auflösung und der lateralen Auflösung erhält man unter der Annahme eines ellipsoid-förmigen Fokus das detektierte Pixelvolumen V_{Pixel} :

$$V_{\text{Pixel}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot z_{\text{res}} \cdot r_{\text{res}}^2 \approx 0,17 \mu\text{m}^3.$$

- 10 Die maximale Dichte ρ der Fluoreszenzmoleküle beträgt 200 Moleküle pro μm^3 . Damit beträgt die Zahl der Moleküle im Fokus N_{Fokus} :

$$N_{\text{Fokus}} = \rho \cdot V_{\text{Pixel}} \approx 34$$

- 15 Bei optimal eingestellter Bestrahlungsstärke ist die Emissionsrate E_m gleich der Anregungsrate. Das heißt, im dynamischen Gleichgewicht befinden sich die eine Hälfte der Moleküle im Grundzustand und die andere im angeregten Zustand. Im vorliegenden Beispiel sind Triplettzustände nicht vernachlässigbar. Die Emissionsrate pro Molekül beträgt damit:

$$20 \quad E_m = \frac{1}{2 \cdot (\tau_s + W_T \cdot \tau_T)} \approx 15 \mu\text{s}^{-1}.$$

- 25 Bei einer Detektionszeit von 1 μs werden damit pro Pixel ca. 510 Photonen emittiert. Da das System beim verwendeten Objektiv nur ca. 1% aller emittierten Photonen detektiert, erhält man für die detektierte Signalthöhe einen Wert von ca. 5 Photonen pro Pixel. Dies entspricht einem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) von ca.:

$$S/N \approx 2,3$$

- 30 Liegt dieser Wert unterhalb der vom Anwender vorgegebenen Schwelle, muß auf Auflösung verzichtet werden. Damit steigt das detektierte Pixelvolumen und somit die Zahl der detektierten Photonen pro Pixel. Außerdem nimmt die Zahl der aufzunehmenden Schichten ab, was zu einem geringeren Ausbleichen der Probe führt.

- Verzichtet man nicht zugunsten eines besseren Signal-Rausch-Verhältnisses auf Auflösung, bleibt die Zahl der optischen Schnitte bei 270. Das bedeutet, das die gesamte Probenfläche 270 mal für die Zeit von 2 μs der oben berechneten Bestrahlungsstärke ausgesetzt ist. Der Anteil der danach noch nicht gebleichten Moleküle n/n_0 beträgt:

$$40 \quad \frac{n}{n_0} = \exp\left(-\Lambda \cdot \frac{270 \cdot 2 \mu\text{s}}{2 \cdot (\tau_s + W_T \cdot \tau_T)}\right) \approx 0,8.$$

- Da die Möglichkeit der Erhöhung der Aufnahmezeit mit der Zunahme der Bildschnitte im benutzten System nicht vorgesehen und technisch schwer zu realisieren ist, bewirkt das Ausbleichen der Probe, daß die Helligkeit der zuletzt aufgenommenen Schichten ca. 80% der zuerst aufgenommenen Schichten beträgt. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird auf ca. 2 reduziert.

- 45 5. Wird auch dieses Signal-Rausch-Verhältnis vom Anwender akzeptiert, ist nur noch die Photomultiplier-Spannung an die maximal zu erwartende Signalthöhe von ca. 5 Photonen pro Pixel anzupassen. Für die gegebene Aufnahmezeit pro Pixel ergibt sich eine Photomultiplier-Spannung von ca. 720 V.

- Es ist zu bemerken, daß die verwendete Probe eine verhältnismäßig hohe Dichte an Fluoreszenzmolekülen aufweist. In der Praxis kann es vorkommen, daß Proben mit weniger als 10 Molekülen pro μm^3 betrachtet werden. Um ausreichende Aufnahmequalitäten zu erzielen, muß in solchen Fällen über mehrere Messungen gemittelt werden.

- Die Lebensdauer des Triplettzustandes kann durch die Anwesenheit von z. B. Sauerstoff reduziert werden, oder liegt bei vielen Farbstoffen schon im isolierten Zustand unter der des Fluorescein-Triplettzustandes. Im vorliegenden Beispiel bewirkt eine Verkürzung der Lebensdauer der Triplettzustände eine Erhöhung der optimalen Bestrahlungsstärke, höhere Emissionsraten und damit auch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis im Bild. Allerdings wird die Probe während der Aufnahme aufgrund der höheren Strahlenbelastung stärker ausgebleicht.

- Das Spektrum der Bleichraten ist bei den unterschiedlichen Farbstoffen sehr weit gefächert – abhängig von der Umgebung der Moleküle – und kann bei festen Präparaten durch Anti-Bleichmittel um ein Vielfaches reduziert werden. Die Bleichrate von Fluorescein stellt einen typischen mittleren Wert dar.

- Abschließend sei ganz besonders hervorgehoben, daß die voranstehend genannten Verfahrensschritte und Ausführungsbeispiele bevorzugte Ausgestaltungen darstellen, die erfindungsgemäße Lehre jedoch nicht auf diese Ausführungen des beanspruchten Verfahrens einschränken. Sämtliche Verfahrensschritte lassen sich unter Bezugnahme auf die gemäß Patentanspruch 1 beanspruchte Lehre auch in isolierter Form anwenden, und zwar unabhängig von den übrigen Patentansprüchen.

Numerische Apertur des Objektivs

$$NA = n \sin \alpha \quad 5$$

Geometrische Quanteneffizienz des Objektivs

$$QE_{\text{Objektiv}} = 0,5 (1 - \cos \alpha) \quad 10$$

Durchmesser der Eintrittspupille des Objektivs

$$d_{EP} = 2 \cdot f_o \cdot NA$$

Brennweite des Objektivs (200 mm = Fokus der Tubuslinse) 15

$$f_o = \frac{200 \text{ mm}}{M}$$

Kantenlänge des Sehfeldes ($Z = 1$ Maximales Sehfeld) 20

$$L = \frac{L'}{M \cdot Z}$$

Statistisches Rauschen 25

$$S/N = \sqrt{Ph/P}$$

Zahl der unterscheidbaren Graustufen

$$g = 1 + S/N \quad 30$$

Information im Bild

$$Inf = n_p \cdot \log_2(g) \quad 35$$

Axiales Auflösungsvermögen nach Kino

$$z_{\text{Kino}} = \frac{0,45 \lambda}{n (1 - \cos \alpha)} \quad 40$$

Laterales Auflösungsvermögen nach Kino

$$r_{\text{Kino}} = \frac{0,4 \lambda}{NA} \quad 45$$

Laterales Auflösungsvermögen des konventionellen Mikroskops

$$r_{1/2} = \frac{0,61 \lambda}{NA} \quad 50$$

Radius des zentralen Airy Scheibchens im Objekt

$$r_{\text{Airy}} = \frac{1,22 \lambda}{2NA} = 3,8 \quad 55$$

Umrechnung physikalischer Einheiten in optische Einheiten

$$v = k \cdot r \cdot \sin \alpha$$

$$u = 4 \cdot k \cdot z \cdot \sin^2 \frac{\alpha}{2} \quad 60$$

Fit für die axiale Auflösung unter Berücksichtigung des Pinholeradius

$$z_{\text{res}} = C \cdot \left(\frac{0,45 \cdot \lambda}{n(1 - \cos \alpha)} \cdot e^{\frac{v_d}{0,9 \cdot \pi}} + \frac{v_d \cdot \lambda}{2 \cdot \pi \cdot NA \cdot \tan \alpha / 2} \right) \quad 65$$

$$C = 1,41 \frac{\lambda_{Em}}{\lambda_{Ex}} \text{ in Fluoreszenz}$$

$$C = 1 \quad \text{in Reflexion.}$$

Anregungsrate der Fluoreszenzmoleküle

$$Ex = \frac{E \cdot \sigma}{h\nu}$$

Emissionsrate der Fluoreszenzmoleküle

$$Em = \frac{1}{\tau_{1/2}}$$

Optimale Bestrahlungsstärke im Fokus

$$E_{\text{Fokus}} = \frac{h\nu}{\sigma \cdot \tau_{1/2}}$$

Signalhöhe bei optimaler Bestrahlungsstärke

$$S = N \frac{1}{\tau_{1/2}} \frac{Ex}{Ex + \frac{1}{\tau_{1/2}}}$$

S/N in Abhängigkeit von Signalhöhe und Laserrauschen

$$S/N = \frac{S}{\sqrt{S + (S \cdot N_{\text{Laser}})^2}}$$

Erwartetes S/N bei angelegter Photomultiplier-Spannung

$$S/N = \frac{1}{\sqrt{\frac{\Psi \cdot U^{7,5}}{S_{\text{digit}}} + N_{\text{Laser}}^2}}$$

Patentansprüche

1. Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines vorzugsweise konfokalen Laserscanmikroskops, wobei die Einstellung der Systemparameter über einen Steuercomputer erfolgt, **gekennzeichnet durch** eine Benutzerführung im Dialog, wobei dem Benutzer auf Eingabe mindestens eines Objektparameters und/oder mindestens eines ggf. auswählbaren Systemparameters Einstellungen der übrigen Systemparameter vorgeschlagen werden und/oder die übrigen Systemparameter automatisch eingestellt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß auf Eingabe mindestens eines Objektparameters und/oder mindestens eines ggf. auswählbaren Systemparameters und/oder mindestens einer definierbaren Problemstellung betreffend die Bildaufnahme und/oder betreffend das aufzunehmende Objekt Optimierungspfade zur System-einstellung und/oder Aufnahmestrategien vorgeschlagen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Systemparameter einer ausgewählten Systemeinstellung oder Aufnahmestrategie automatisch eingestellt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß im Dialog die aufzunehmende Objektdimension eingegeben oder ausgewählt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß im Dialog der aufzunehmende Objektbereich eingegeben oder ausgewählt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß im Dialog die Anzahl der optischen Schnitte eingegeben oder ausgewählt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Dialog die aufzunehmende Objekteigenschaft eingegeben oder ausgewählt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß im Dialog die Nachweismethode eingegeben oder ausgewählt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Nachweismethode um die Anwendung des Fluoreszenzverfahrens handelt.

10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Nachweismethode um die Anwendung des Reflexionsverfahrens handelt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß im Dialog die Verwendung eines geeigneten Objektivs mit möglichst hoher numerischer Apertur zur Erzielung maximaler Auflösung vorgeschlagen wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß im Dialog die mit dem ausgewählten Objektiv maximal erzielbare Auflösung mitgeteilt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß im Dialog die unter Zugrundelegung ausgewählter bzw. ermittelter und ggf. bereits eingestellter Systemparameter aktuelle Auflösung mitgeteilt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß im Dialog die Anzahl der Pixel pro Bildebene vorgeschlagen wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die im Dialog einzugebende oder auszuwählende Objekteigenschaft zur Ermittlung der optimalen Bestrahlungsstärke dient.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die optimale Bestrahlungsstärke bzw. Laserleistung im Dialog vorgeschlagen wird.
17. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die optimale Bestrahlungsstärke bzw. Laserleistung automatisch eingestellt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß zur Einstellung des Detektionspinhole-Durchmessers ein optimierter Wert im Dialog vorgeschlagen wird, bei dem die Auflösung der Bildaufnahme bei noch brauchbarem Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Bildaufnahme maximal ist.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß zur Einstellung des Detektionspinhole-Durchmessers ein optimierter Wert im Dialog vorgeschlagen wird, bei dem das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Bildaufnahme bei noch brauchbarer Auflösung der Bildaufnahme maximal ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß bei Vorgabe oder Veränderung mindestens eines Systemparameters im Dialog alle diejenigen Systemparameter mitgeteilt werden, die durch die Vorgabe oder Veränderung beeinflußt werden.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß mittels Benutzerführung im Dialog mitgeteilt wird, wie unter Zugrundelegung der Vorgabe oder der Veränderung eines Systemparameters eine Bildaufnahme mit bestmöglicher Qualität realisierbar ist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein für die Aufnahme bzw. Applikation wichtiges Kriterium zu dessen Optimierung vorgebar ist und daß aufgrund dieser Vorgabe die weiteren Systemparameter im Dialog vorgeschlagen und/oder automatisch eingestellt werden.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem vorgegebenen Kriterium um das zu erzielende Signal-zu-Rausch-Verhältnis handelt.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß mittels Benutzerführung im Dialog Hilfestellungen oder Lösungen für vorgegebene Problemsituationen angeboten werden.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Problemsituationen um die Probleme:
 - "die Probe bleicht zu stark (bei Fluoreszenzobjekten)" und/oder
 - "die Bilddaten sind verrauscht" und/oder
 - "die Meßzeit ist zu lange" und/oder
 - "die Auflösung ist zu gering"
 handelt.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß unter Zugrundelegung der Hilfestellungen die Optimierung im Dialog durchführbar ist.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die zumindest teilweise voneinander abhängigen Systemparameter mittels Algorithmus bestimmt werden.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Systemparameter unter Berücksichtigung sich gegenseitig ausschließender Eigenschaften bzw. Einstellungen im Dialog vorgeschlagen und nach Auswahl oder automatisch eingestellt werden.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Systemparameter unter Berücksichtigung der Vorgaben aus einem in einer Datenbank abgelegten Expertensystem abgerufen werden.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Systemparameter unter Berücksichtigung der Vorgaben unter Verwendung von Fuzzy-Logic ermittelt und nach Auswahl oder automatisch eingestellt werden.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß bei Vorgabe und/oder Änderung mindestens eines Systemparameters im Dialog mitgeteilt wird, daß und bejahendenfalls inwiefern die Bildaufnahme im Hinblick auf eine Eigenschaft der Bildaufnahme, so beispielsweise im Hinblick auf die Auflösung, das Sampling, etc., beeinflußt wird.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß dem Benutzer vor, während und/oder nach der Bildaufnahme eine Information hinsichtlich der Qualität der zu erzielenden Bildaufnahme vermittelt wird.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß ein den Benutzer im Dialog führendes Lernprogramm zur optimalen – vorzugsweise objekt- und/oder problemspezifischen – Systemeinstellung und/oder Aufnahmestrategie aktivierbar ist.

- Leerseite -

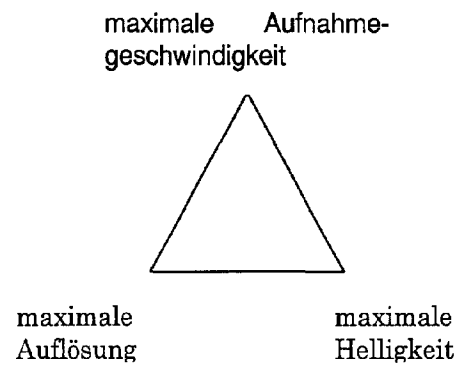


Fig. 1

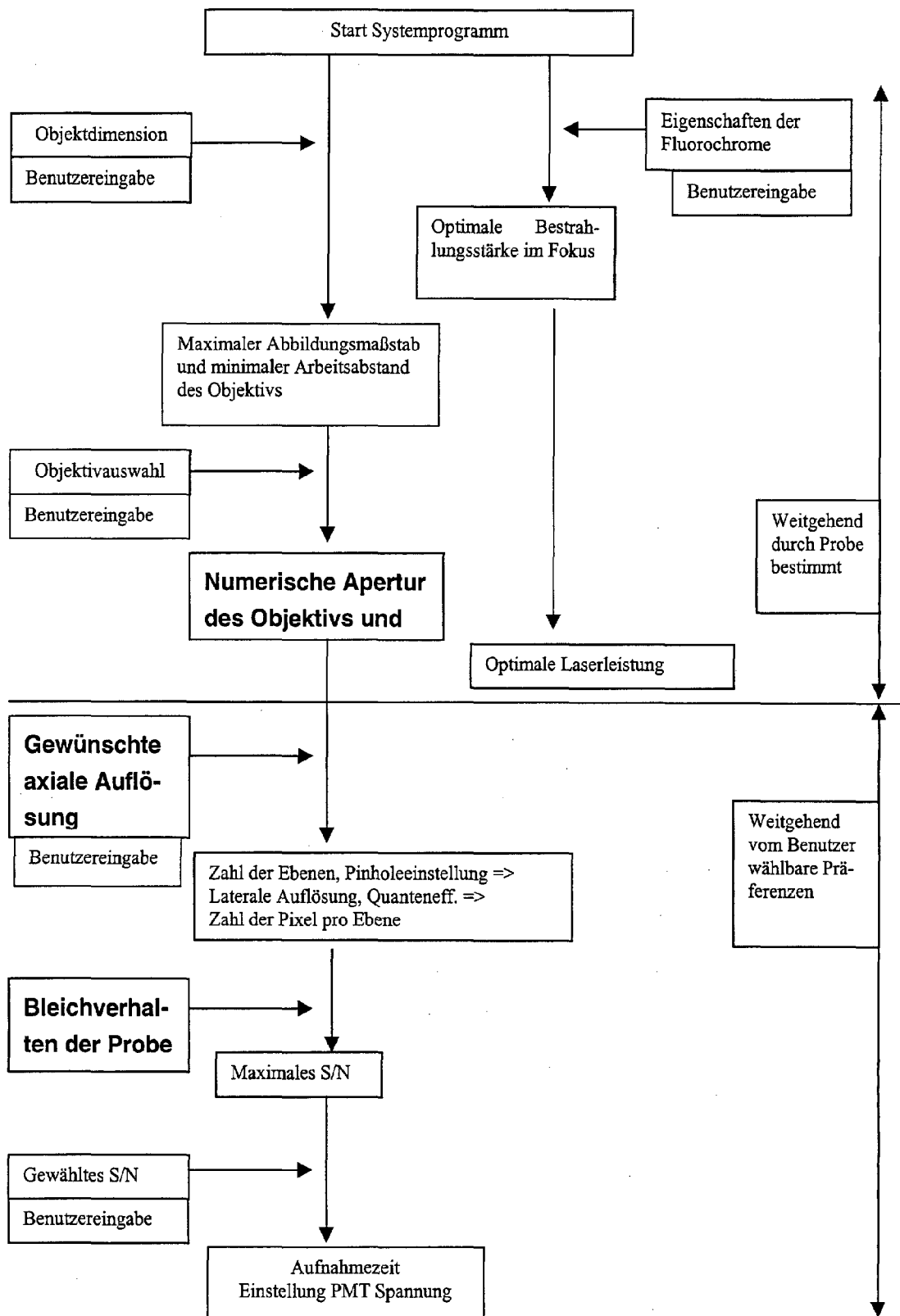


Fig. 2